

PENGOPTIMUMAN, PENULENAN DAN PENCIRIAN
ENZIM MANNANASE DARIPADA *Aspergillus niger*
USM F4 MELALUI PEMFERMENTASIAN SUBSTRAT
PEPEJAL (SSF) DENGAN MENGGUNAKAN ISIRONG
KELAPA SAWIT SEBAGAI SUBSTRAT.

SYARIFAH BINTI AB RASHID

UNIVERSITI SAINS MALAYSIA

2009

PENGOPTIMUMAN, PENULENAN DAN PENCIRIAN ENZIM
MANNANASE DARIPADA *Aspergillus niger* USM F4 MELALUI
PEMFERMENTASIAN SUBSTRAT PEPEJAL (SSF) DENGAN
MENGGUNAKAN ISIRONG KELAPA SAWIT SEBAGAI SUBSTRAT.

Oleh

SYARIFAH BINTI AB RASHID

Tesis ini diserahkan untuk memenuhi keperluan bagi Ijazah Sarjana Sains

MEI 2009

BUAT MAMA DAN ABAH YANG
SENTIASA MENDOAKAN KEJAYAAN
ANAKMU...

PENGHARGAAN

Syukur ke hadrat yang Maha Esa atas kurniaanNya sepanjang menjalankan projek ini. Jutaan terima kasih kepada penyelia utama saya, Professor Dr. Hajah Darah Ibrahim atas idea, bimbingan serta kesabaran beliau yang menjadi antara penyumbang utama kejayaan projek ini. Penghargaan ini juga ditujukan buat Professor Dr. Haji Ibrahim Che Omar, selaku penyelia bersama projek ini yang tidak pernah berputus asa memberi nasihat serta sokongan padu beliau kepada saya.

Buat sahabat-sahabat di Makmal Penyelidikan Bioteknologi Industri (IBRL); Chee Keong, Pei Kheng, Muhammad Odeh, Mang Ling, Nursyuhadah, Puan Suraya dan suami (Encik Zulkafli), Puspa dan suami (Maulana), Kok Chang, Mei Sing, Syarifah Najihah, Hassan, Wee Yee, Chai Sin, Anuradha, Chee Khoon, Mazuin, Azlinah, Aishah, Sheh Hong, Soon, Tee Gee, Teh Faridah, Syazni, Hanani dan Ramli. Terima kasih atas tunjuk ajar, persahabatan dan kenangan indah yang telah diberikan.

Khas untuk keluarga saya iaitu mama (Nik Zabidah) dan abah (Ab Rashid) serta keluarga (abang dan adik-adik) dan sahabat yang menyokong saya untuk terus berdiri iaitu Siti Ruhani, Nur Afzan, Nur Faizah, Nurul Izza dan Siti Maysarah.

Tidak lupa juga buat kakitangan Pusat Pengajian Sains Kajihayat yang memberikan kerjasama dan kemudahan untuk saya menjalankan projek ini.

KANDUNGAN**MUKASURAT**

PENGHARGAAN	ii
KANDUNGAN	iii
SENARAI RAJAH	xiii
SENARAI JADUAL	xvii
SENARAI GAMBARFOTO	xviii
SENARAI SINGKATAN SIMBOL DAN PERKATAAN	xx
ABSTRAK	xxii
ABSTRACT	xxv

BAB 1 PENGENALAN

1.1	Kepelbagaian sisa buangan agroindustri	1
1.2	Masalah semasa berkaitan dengan sisa buangan agroindustri	1
1.3	Penukaran sisa buangan agroindustri kepada bentuk bernilai	3
1.4	Objektif kajian	5

BAB 2 TINJAUAN BACAAN

2.1	Komponen utama dalam sisa agroindustri: lignoselulosa	7
2.1.1	Selulosa	7
2.1.2	Lignin	9
2.1.3	Hemiselulosa	9
2.2	Kelapa sawit sebagai sumber ekonomi Malaysia	10
2.3	Proses penghasilan minyak dan sisa buangan kelapa sawit	13

2.3.1	Pengekstrakan mekanikal	14
2.3.2	Pengekstrakan cecair dan kimia	15
2.3.3	Gabungan pengekstrakan mekanikal dan cecair	15
2.4	Nilai pemakanan dalam isirong kelapa sawit (PKC)	17
2.5	Takrifan proses pemfermentasian substrat pepejal (SSF)	20
2.6	Aspek umum dalam SSF	20
2.6.1	Penglibatan mikroorganisma dalam SSF	21
2.6.2	Pemilihan substrat untuk dikendalikan dalam SSF	25
2.6.3	Pemilihan proses parameter dan pengoptimumannya	26
2.7	Pertimbangan aspek kejuruteraan dalam SSF	27
2.7.1	Permodelan dalam SSF	28
2.7.2	Pengelasan dan reka bentuk bioreaktor dalam SSF	28
	2.7.2.1 Bioreaktor dulang	29
	2.7.2.2 Bioreaktor dasar padat	30
	2.7.2.3 Bioreaktor dram berputar	30
	2.7.2.4 Bioreaktor dasar berbendalir	31
2.8	Perbandingan pemfermentasian substrat pepejal (SSF) dengan pemfermentasian kultur tenggelam (SmF)	32
2.9	Permasalahan berkaitan dengan penggunaan SSF	34
2.10	Penggunaan SSF dari dahulu hingga kini	35
2.10.1	Penghasilan enzim melalui SSF	37
	2.10.1.1 Enzim pengurai mannan	40
	2.10.1.2 Kepentingan enzim mannanase dalam pelbagai	42

bidang	
2.10.1.2.1 Mannanase dalam bidang makanan haiwan ternakan	43
2.10.1.2.2 Mannanase dalam bidang biopelunturan pulpa	44
2.10.1.2.3 Mannanase dalam bidang makanan	44
2.10.1.2.4 Mannanase dalam bidang detergen	46

BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH

3.1	Substrat untuk pemfermentasian substrat pepejal	47
3.2	Sumber kulat	47
3.3	Penyediaan ampaian spora sebagai inokulum	49
3.4	Penyaringan kulat penghasil mannanase yang berpotensi	51
3.5	Pengecaman pencilan USM F4	51
3.5.1	Pengecaman kulat pencilan USM F4 berdasarkan ciri-ciri morfologi koloni	51
3.5.2	Pengecaman kulat pencilan USM F4 melalui pemerhatian di bawah mikroskop cahaya	52
3.5.3	Pengecaman kulat melalui pemerhatian di bawah mikroskop elektron penskanan (SEM)	52
3.6	Kaedah analisis	53
3.6.1	Pengekstrakan enzim mannanase	53
3.6.2	Pengasaian enzim mannanase	54
3.6.3	Kaedah menentukan pertumbuhan kulat USM F4	55

3.7	Pengoptimuman penghasilan mannanase dan pertumbuhan pencilan USM F4 dalam sistem kelalang goncangan (Erlenmeyer 250 ml)	57
3.7.1	Penyediaan profil sebelum pengoptimuman parameter fizikal	57
3.7.2	Pengoptimuman keadaan pengkulturan untuk strain USM F4 pada PKC	58
3.7.2.1	Kesan kandungan air	58
3.7.2.2	Kesan saiz substrat	59
3.7.2.3	Kesan saiz inokulum	59
3.7.2.4	Kesan jisim substrat	60
3.7.2.5	Kesan suhu	60
3.7.2.6	Kesan pengadukan	60
3.7.3	Profil selepas pengoptimuman parameter fizikal	61
3.7.4	Pengoptimuman parameter kimia dalam sistem kelalang goncangan	61
3.7.4.1	Kesan penambahan sumber karbon ke atas penghasilan enzim mannanase dan pertumbuhan kulat	62
3.7.4.2	Kesan penambahan nitrogen ke atas penghasilan enzim mannanase dan pertumbuhan kulat	62
3.7.5	Profil selepas pengoptimuman parameter kimia	63
3.8	Pengoptimuman penghasilan mannanase dan pertumbuhan pencilan USM F4 dalam sistem dulang cetek	64
3.8.1	Profil ketebalan substrat bagi penghasilan enzim mannanase	64

	serta pertumbuhan kulat di dalam dulang bersaiz 27x19x6 cm	
3.8.2	Pengoptimuman parameter fizikal bagi penghasilan mannanase serta pertumbuhan kulat	66
3.8.2.1	Kesan kandungan air	66
3.8.2.2	Kesan saiz substrat	66
3.8.2.3	Kesan saiz inokulum	67
3.8.2.4	Kesan suhu	67
3.8.2.5	Kesan pengadukan	68
3.8.3	Profil penghasilan enzim mannanase serta pertumbuhan kulat selepas pengoptimuman sistem dulang (saiz 27x19x6 cm)	68
3.8.4	Profil ketebalan substrat bagi penghasilan enzim mannanase serta pertumbuhan kulat dalam sistem dulang (saiz 45x40x7 cm)	69
3.8.5	Pengoptimuman parameter fizikal bagi penghasilan mannanase serta pertumbuhan kulat.	70
3.8.5.1	Kesan kandungan air	70
3.8.5.2	Kesan saiz substrat	70
3.8.5.3	Kesan saiz inokulum	70
3.8.5.4	Kesan suhu	71
3.8.5.5	Kesan pengadukan	71
3.8.6	Profil penghasilan mannanase dan pertumbuhan kulat selepas pengoptimuman dalam sistem dulang (saiz 45x40x7 cm)	72
3.9	Pemerhatian penguraian struktur PKC oleh kulat pencilan USM F4	72
3.10	Penulenan enzim mannanase	73

3.10.1 Pemekatan enzim (penurasan ultra)	74
3.10.2 Kromatografi penurasan gel	74
3.10.2.1 Penyediaan gel Superdex 75	74
3.10.2.2 Penyediaan turus kromatografi dan pemadatan gel	75
3.10.2.3 Pengesanan gelembung udara dan keretakan	75
3.10.2.4 Penetapan kadar aliran serta memasukkan sampel	75
3.10.3 Kromatografi penukaran anion Q-sefaroza aliran laju	76
3.10.3.1 Penentuan pH yang sesuai untuk penukaran anion kromatografi	77
3.10.3.2 Penentuan keadaan pengelutan	77
3.10.3.3 Pengutipan sampel bagi keadaan optimum kromatografi penukaran anion	78
3.11 Penentuan protein	79
3.12 Penentuan ketulenan enzim mannanase dengan Elektroforesis Poliakrilamida Natrium Dodesil Sulfat (SDS-PAGE)	80
3.13 Pewarnaan perak nitrat gel elektroforesis	81
3.14 Penentuan berat molekul enzim mannanase tulen	82
3.15 Pencirian enzim tulen	83
3.15.1 Kesan pH ke atas aktiviti mannanase kasar dan tulen daripada pencilan USM F4	83
3.15.2 Kesan suhu ke atas aktiviti mannanase daripada pencilan USM F4	84
3.15.3 Kesan ion logam dan bahan kimia	84
3.15.4 Kesan kespesifikan dan kepekatan substrat	85

BAB 4 KEPUTUSAN

4.1	Penyaringan kulat penghasil mannanase yang berpotensi	86
4.2	Pengecaman kulat pencilan USM F4	88
4.2.1	Pengecaman morfologi kulat pencilan USM F4	88
4.2.2	Pengecaman morfologi mikroskopi kulat pencilan USM F4	92
4.3	Pengoptimuman penghasilan mannanase dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM F4 dalam sistem kelalang goncangan.	95
4.3.1	Pengoptimuman parameter fizikal ke atas penghasilan mannanase dan pertumbuhan kulat.	95
4.3.1.1	Profil sebelum pengoptimuman parameter fizikal ke atas penghasilan mannanase dan pertumbuhan kulat	95
4.3.1.2	Kesan kandungan air	97
4.3.1.3	Kesan saiz substrat	99
4.3.1.4	Kesan saiz inokulum	101
4.3.1.5	Kesan jisim substrat	103
4.3.1.6	Kesan suhu	105
4.3.1.7	Kesan pengadukan	105
4.3.1.8	Profil selepas pengoptimuman parameter fizikal	108
4.3.2	Pengoptimuman parameter kimia terhadap penghasilan mannanase dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM F4	110
4.3.2.1	Kesan penambahan sumber karbon	110
4.3.2.2	Kesan kepekatan molases	112
4.3.2.3	Kesan penambahan sumber nitrogen	114

4.3.2.4	Kesan kepekatan ammonium nitrat	116
4.3.2.5	Profil selepas pengoptimuman parameter kimia	118
4.4	Pengoptimuman penghasilan mannanase dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM F4 dalam sistem dulang	121
4.4.1	Pengoptimuman penghasilan mannanase dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM F4 dalam dulang bersaiz 27x19x6 cm	121
4.4.1.1	Profil kesan ketebalan substrat	121
4.4.1.2	Kesan kandungan air	125
4.4.1.3	Kesan saiz substrat	127
4.4.1.4	Kesan saiz inokulum	129
4.4.1.5	Kesan suhu	129
4.4.1.6	Kesan pengadukan	131
4.4.1.7	Profil selepas pengoptimuman bagi penghasilan mannanase oleh <i>A. niger</i> USM F4	133
4.4.2	Pengoptimuman penghasilan mannanase dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM F4 dalam dulang bersaiz 45x40x7 cm	136
4.4.2.1	Profil kesan ketebalan substrat	139
4.4.2.2	Kesan kandungan air	142
4.4.2.3	Kesan saiz substrat	144
4.4.2.4	Kesan saiz inokulum	144
4.4.2.5	Kesan suhu	147
4.4.2.6	Kesan pengadukan	149
4.4.2.7	Profil selepas pengoptimuman bagi penghasilan	151

	mannanase oleh <i>A. niger</i> USM F4	
4.5	Penguraian struktur PKC oleh <i>A. niger</i> USM F4	155
4.6	Penulenan enzim mannanase	158
4.6.1	Penurasan gel	158
4.6.2	Kromatografi penukaran anion	158
4.6.3	Penentuan ketulenan enzim mannanase dengan Elektroforesis Poliakrilamida Natrium Dodesil Sulfat (SDS-PAGE)	161
4.6.4	Penentuan berat molekul enzim mannanase tulen daripada <i>A. niger</i> USM F4	164
4.6.5	Pencirian enzim mannanase tulen daripada <i>A. niger</i> USM F4	164
4.6.5.1	Kesan pH terhadap aktiviti mannanase	164
4.6.5.2	Kestabilan enzim mannanase terhadap pH	168
4.6.5.3	Kesan suhu terhadap aktiviti mannanase	170
4.6.5.4	Kestabilan enzim mannanase terhadap suhu	172
4.6.5.5	Kesan ion logam dan bahan kimia ke atas enzim mannanase tulen	174
4.6.5.6	Kesan kespesifikan dan kepekatan substrat	176

BAB 5 PERBINCANGAN	
5.1 Penyaringan dan pemilihan kulat dan substrat untuk menghasilkan enzim mannanase melalui pemfermentasian substrat pepejal	180
5.2 Profil pengoptimuman parameter bagi penghasilan mannanase oleh <i>A. niger</i> USM F4	182
5.3 Pengoptimuman parameter fizikal ke atas penghasilan mannanase dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM F4 dalam sistem kelalang goncangan dan sistem dulang	183
5.4 Penulenan dan pencirian mannanase daripada <i>A. niger</i> USM F4	197
BAB 6 KESIMPULAN DAN KAJIAN PADA MASA DEPAN	203
RUJUKAN	207
LAMPIRAN	225
SENARAI KERTAS KERTAS KERJA PERSIDANGAN	230

SENARAI RAJAH**MUKASURAT**

Rajah 2.1	Penghasilan minyak kelapa sawit yang digunakan di Malaysia	16
Rajah 2.2	Pertumbuhan kulat dan cara penembusan pada substrat	23
Rajah 2.3	Proses penyerangan secara berenzim pada struktur galaktoglukomannan	42
Rajah 3.1	Bahagian tengah slaid haemositometer yang diperbesarkan	50
Rajah 4.1	Penyaringan pelbagai jenis pencilan kulat yang berpotensi dalam menghasilkan mannanase	87
Rajah 4.2	Profil penghasilan enzim mannanase dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM F4 sebelum pengoptimuman parameter fizikal	96
Rajah 4.3	Kesan kandungan air terhadap penghasilan mannanase dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM F4	98
Rajah 4.4	Kesan saiz substrat terhadap penghasilan mannanase dan pertumbuhan kulat	100
Rajah 4.5	Kesan saiz substrat terhadap penghasilan mannanase dan pertumbuhan kulat	102
Rajah 4.6	Kesan jisim substrat ke atas penghasilan mannanase dan pertumbuhan kulat	104
Rajah 4.7	Kesan suhu ke atas penghasilan mannanase dan pertumbuhan kulat	106
Rajah 4.8	Kesan pengadukan terhadap penghasilan mannanase oleh <i>A. niger</i> USM F4	107

Rajah 4.9	Profil penghasilan enzim mannanase dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM F4 selepas pengoptimuman parameter fizikal	109
Rajah 4.10	Kesan penambahan sumber karbon ke atas penghasilan mannanase dan pertumbuhan kulat	111
Rajah 4.11	Kesan pelbagai kepekatan molases terhadap penghasilan mannanase dan pertumbuhan kulat	113
Rajah 4.12	Kesan penambahan sumber nitrogen ke atas penghasilan mannanase oleh <i>A. niger</i> USM F4	115
Rajah 4.13	Kesan kepekatan ammonium nitrat terhadap penghasilan mannanase dan pertumbuhan kulat	117
Rajah 4.14	Profil selepas pengoptimuman parameter kimia bagi penghasilan mannanase oleh <i>A. niger</i> USM F4	119
Rajah 4.15	Perbandingan profil sebelum dengan selepas pengoptimuman parameter fizikal dan kimia	120
Rajah 4.16	Profil kesan ketebalan substrat di dalam dulang bersaiz 27x19x6 cm	122
Rajah 4.17	Kesan kandungan air terhadap penghasilan mannanase dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM F4	126
Rajah 4.18	Kesan saiz substrat terhadap penghasilan mannanase dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM F4	128
Rajah 4.19	Kesan saiz inokulum terhadap penghasilan mannanase oleh <i>A. niger</i> USM F4	130
Rajah 4.20	Kesan suhu terhadap penghasilan mannanase oleh <i>A. niger</i> USM F4	132

Rajah 4.21	Kesan pengadukan terhadap penghasilan mannanase oleh <i>A. niger</i> USM F4	134
Rajah 4.22	Profil selepas pengoptimuman bagi penghasilan mannanase oleh <i>A. niger</i> USM F4	135
Rajah 4.23	Perbandingan profil sebelum dan selepas pengoptimuman parameter bagi sistem dulang 27x19x6 cm	137
Rajah 4.24	Perbandingan profil selepas pengoptimuman bagi sistem kelalang goncangan dengan sistem dulang 27x19x6 cm	138
Rajah 4.25	Profil kesan ketebalan substrat terhadap penghasilan mannanase dan pertumbuhan kulat	140
Rajah 4.26	Kesan kandungan air ke atas penghasilan mannanase dan pertumbuhan kulat bagi dulang bersaiz 45x40x7 cm	143
Rajah 4.27	Kesan saiz substrat ke atas penghasilan mannanase dan pertumbuhan kulat	145
Rajah 4.28	Kesan saiz inokulum ke atas penghasilan mannanase dan pertumbuhan kulat	146
Rajah 4.29	Kesan suhu ke atas penghasilan mannanase dan pertumbuhan kulat	148
Rajah 4.30	Kesan pengadukan terhadap penghasilan mannanase dan pertumbuhan kulat	150
Rajah 4.31	Profil selepas pengoptimuman bagi penghasilan mannanase oleh <i>A. niger</i> USM F4	152
Rajah 4.32	Perbandingan profil selepas pengoptimuman bagi dua dulang	153

	yang berbeza saiz terhadap penghasilan mannanase dan pertumbuhan kulat	
Rajah 4.33	Perbandingan profil selepas pengoptimuman antara sistem kelalang goncangan dengan sistem dulang bersaiz 45x40x7 cm	154
Rajah 4.34	Profil pengelutan enzim mannanase melalui kromatografi penurasan gel Superdex 75	159
Rajah 4.35	Profil pengelutan turus kromatografi penukaran anion dengan menggunakan larutan penimbal asid sitrik-trinatrium sitrat 50 mM (pH 5.0) dan 0.8 M NaCl	160
Rajah 4.36	Penentuan berat molekul enzim mannanase tulen dengan menggunakan kaedah SDS-PAGE	165
Rajah 4.37	Kesan pH terhadap aktiviti mannanase tulen dan kasar	166
Rajah 4.38	Kestabilan enzim mannanase tulen dan mannanase kasar terhadap pelbagai pH	169
Rajah 4.39	Kesan pelbagai suhu terhadap aktiviti mannanase tulen dan kasar	171
Rajah 4.40	Kestabilan enzim mannanase tulen dan kasar terhadap pelbagai suhu	173
Rajah 4.41	Kesan ion logam dan bahan kimia ke atas aktiviti mannanase tulen	175
Rajah 4.42	Kesan kespesifikan substrat ke atas enzim mannanase tulen	178
Rajah 4.43	Kesan pelbagai kepekatan gam kacang belalang (LBG) ke atas mannanase tulen	179

SENARAI JADUAL**MUKASURAT**

Jadual 2.1	Peratusan komponen lignoselulosa dalam residu agroindustri	8
Jadual 2.2	Enzim utama hemiselulase dan pengelasannya	11
Jadual 2.3	Komposisi asid amino dalam PKC	18
Jadual 2.4	Kandungan pelbagai nutrisi yang terdiri daripada sumber garam mineral serta fiber dalam PKC	19
Jadual 2.5	Peranan beberapa mikroorganisma dalam proses SSF	24
Jadual 2.6	Kelebihan SSF berbanding dengan SmF daripada segi bioteknologi	33
Jadual 2.7	Penghasilan pelbagai jenis enzim daripada sumber kulat yang dipencilkan daripada tanah di Malaysia	39
Jadual 4.1	Ringkasan penulenan enzim mannanase dengan menggunakan pemekatan mikro, gel superdex 75 dan Q-sefaroza aliran laju	162
Jadual 4.2	Perencatan aktiviti mannanase tulen oleh ion logam dan bahan kimia	177
Jadual 4.3	Kesan penggunaan substrat yang berbeza terhadap produktiviti mannanase tulen	178

SENARAI GAMBARFOTO**MUKASURAT**

Gambarfoto 2.1	Bahagian luar dan dalaman buah kelapa sawit	12
Gambarfoto 2.2	Pokok kelapa sawit yang tumbuh di Malaysia	12
Gambarfoto 3.1	PKC yang diperhatikan dengan mata kasar	48
Gambarfoto 3.2	Struktur PKC yang diperhatikan secara mikroskopik di bawah mikroskop cahaya pada magnifikasi 10 kali	48
Gambarfoto 3.3	Dulang bersaiz 27x19x6 cm yang digunakan dalam ujikaji penghasilan mannanase	65
Gambarfoto 3.4	Dulang bersaiz 45x40x7 cm yang diuji dalam sistem dulang	65
Gambarfoto 4.1	Pertumbuhan kulat pencilan USM F4 pada agar dekstroza kentang (PDA) selama 4 hari	90
Gambarfoto 4.2	Pertumbuhan kulat pencilan USM F4 pada agar ekstrak malta (MEA) selama 4 hari	90
Gambarfoto 4.3	Pertumbuhan kulat pencilanUSM F4 pada agar Czapek Dox selama 4 hari	91
Gambarfoto 4.4	Struktur-struktur penting pada kulat pencilan USM F4 di bawah mikroskop cahaya	93
Gambarfoto 4.5	Kulat pencilan USM F4 yang dikulturkan selama 4 hari diamati di bawah mikroskop elektron penskanan	93
Gambarfoto 4.6	Struktur PKC yang berketul-ketul dan berwarna perang serta kehitaman yang diamati di bawah pemerhatian mikroskop cahaya	156

Gambarfoto 4.7	PKC yang telah diselaputi oleh miselium <i>A. niger</i> USM F4	156
Gambarfoto 4.8	Keadaan struktur isirong kelapa sawit (PKC) sebelum penguraian dan selepas penguraian oleh kulat di bawah pemerhatian TEM	157
Gambarfoto 4.9	Kehadiran jalur tunggal yang menunjukkan ketulenan enzim mannanase yang dikesan pada gel elektroforesis SDS-PAGE	163

SENARAI SINGKATAN SIMBOL DAN PERKATAAN

%	peratus
⁰ C	darjah Celsius
K	kilo
m	mili
mm	millimeter
mg	miligram
ml	mililiter
μl	mikroliter
nm	nanometer
cm	sentimeter
g	gram
M	molar
i/b	isipadu per berat
b/b	berat per berat
U	Unit
SEM	mikroskop elektron penskanan
TEM	mikroskop elektron transmisi
PDA	agar dektrosa kentang
MEA	agar ekstrak malta
psm	putaran seminit
LBG	gam kacang belalang
DNS	dinitrosalisiklik

min	minit
PKC	isirong kelapa sawit
CSL	air rendaman jagung
kD	kilo Dalton
Rf	pergerakan relatif
CMC	karboksimetilselulosa
SDS	natrium dodesil sulfat
SDS-PAGE	elektroforesis poliakrilamida natrium dodesil sulfat

**PENGOPTIMUMAN, PENULENAN DAN PENCIRIAN ENZIM MANNANASE
DARIPADA *Aspergillus niger* USM F4 MELALUI PEMFERMENTASIAN
SUBSTRAT PEPEJAL (SSF) DENGAN MENGGUNAKAN ISIRONG KELAPA
SAWIT SEBAGAI SUBSTRAT.**

ABSTRAK

Daripada 9 pencilan kulat yang disaring, didapati pencilan USM F4 mampu menghasilkan aktiviti mannanase yang lebih tinggi berbanding dengan 8 pencilan lain. Pengecaman melalui morfologi dan mikroskopik menunjukkan kulat tersebut mempunyai ciri-ciri *Aspergillus niger*. Penghasilan mannanase oleh *A. niger* USM F4 dioptimumkan berdasarkan keadaan pengkulturan dan medium pemfermentasian dalam dua sistem utama; sistem kelalang goncangan dan dulang. Pengoptimuman keadaan pengkulturan dan medium pemfermentasian terdiri daripada parameter fizikal dan kimia. Keadaan optimum di dalam kelalang goncangan berisipadu 250 ml ialah kandungan air 80% (i/b), saiz substrat ≤ 0.5 mm, saiz inokulum sebanyak 1×10^7 spora/ml, jisim substrat berjumlah 10 g, pengeraman pada suhu $30 \pm 2^\circ\text{C}$, tanpa pengadukan, dengan penambahan molases berkepekatan 2% (b/b), ammonium nitrat berkepekatan 4% (b/b) dan tempoh pengkulturan selama 5 hari. Dalam keadaan yang optimum, penghasilan maksimum aktiviti mannanase ialah 433.84 ± 0.40 U/g substrat. Peningkatan sebanyak 54% diperolehi selepas pengoptimuman berbanding sebelum pengoptimuman (281.97 U/g substrat). Bagi sistem dulang, dua saiz telah diuji iaitu 27x19x6 cm dan 45x40x7 cm. Untuk dulang bersaiz 27x19x6 cm, keadaan pengkulturan yang hampir sama dengan sistem kelalang goncangan diperlukan iaitu 0.4 cm ketebalan substrat (100 g jisim

substrat), kandungan air 80% (i/b), saiz substrat ≤ 0.5 mm, saiz inokulum sebanyak 1×10^7 spora/ml, pengermanan pada suhu $30 \pm 2^\circ\text{C}$, tanpa pengadukan, dengan penambahan molases berkepekatan 2% (b/b) serta ammonium nitrat berkepekatan 4% (b/b) dan tempoh pengkulturan selama 5 hari. Bagi dulang bersaiz 45x40x7 cm pula, keadaan pengkulturan dan medium pemfermentasian yang optimum ialah 0.5 cm ketebalan substrat (400 g jisim substrat), kandungan air 80% (i/b), saiz zarah substrat ≤ 0.5 mm, saiz inokulum sebanyak 1×10^7 spora/ml, pengermanan pada suhu $30 \pm 2^\circ\text{C}$, pengadukan setiap 24 jam, dengan penambahan molases berkepekatan 2% (b/b), ammonium nitrat berkepekatan 4% (b/b) dan tempoh pengkulturan selama 5 hari. Jumlah penghasilan mannanase adalah 701.53 ± 0.82 U/g substrat (bagi dulang bersaiz 27x19x6 cm) dan 918.68 ± 1.59 U/g substrat (bagi dulang bersaiz 45x40x7 cm). Jika dibanding dengan sistem kelalang goncangan, peningkatan sebanyak 62% telah terhasil daripada dulang bersaiz 27x19x6 cm manakala peningkatan sebanyak 112% daripada dulang bersaiz 45x40x7 cm. Enzim kasar telah ditulenkan melalui penurasan atau pemekatan ultra, kromatografi penurasan gel Superdex 75 dan kromatografi penukaran anion Q-Sepharosa aliran laju. Mannanase tulen dihomogenkan pada SDS-PAGE dan mempunyai aktiviti spesifik sebanyak 196.42 U/mg, dengan 0.55% hasil dan gandaan penulenan secara keseluruhannya sebanyak 4 kali. Berat molekul mannanase tulen yang dianggarkan melalui SDS-PAGE adalah seberat 47.4 kD. pH dan suhu yang optimum untuk enzim kasar dan tulen masing-masing adalah 4.0 dan 60°C . Kedua-duanya stabil terhadap pH 4.0 dan suhu 60°C sehingga 30 minit masa pengermanan. Bahan kimia dan anion logam seperti Sr^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , EDTA, 2-merkaptotanol dan SDS yang berkepekatan 1.0 mM didapati merencat aktiviti mannanase tulen.

Keseluruhannya, natrium dodesil sulfat (SDS) menjadi komponen perencat yang hebat berbanding anion logam dan bahan kimia yang lain. Aktiviti mannanase adalah spesifik terhadap gam kacang belalang (LBG) dengan kepekatan 0.5% (b/i).

**OPTIMISATION, PURIFICATION AND CHARACTERISATION OF
MANNANASE FROM *Aspergillus niger* USM F4 via SOLID SUBSTRATE
FERMENTATION (SSF) USING PALM KERNEL CAKE AS SUBSTRATE.**

ABSTRACT

From the 9 isolates of fungi that were screened, the isolate USM F4 was found capable to produce higher mannanase activity than the other 8 of fungal isolates. The colony and microscopic morphologies identification showed that this fungal was very identical to *Aspergillus niger*. The production of mannanase by *A. niger* USM F4 was further optimised based on the cultural conditions and fermentation medium in two main systems; flask and tray systems. The optimisation of cultural conditions and fermentation medium consisted physical and chemical parameters. The conditions in a 250 ml flask were 80% (v/w) water content, particle size of substrate ≤ 0.5 mm, inoculum size of 1×10^7 spore/ml, 10g of substrate quantity, incubated at $30 \pm 2^\circ\text{C}$, without mixing effect, with the addition of 2% (w/w) molases and 4% (w/w) ammonium nitrate and with the cultivation time of 5 days. Under the optimum conditions, the maximum production of mannanase activity was 433.84 ± 0.40 U/g substrate. There was an increment of about 54% after optimisation compared with before optimisation (281.97 U/g substrate). For tray system, two sizes were tested those were 27x19x6 cm and 45x40x7 cm. For the tray size of 27x19x6 cm, almost the same conditions for a flask system were requested; 0.4 cm substrate thickness (100 g substrate quantity), 80% (v/w) water content, particle size of substrate ≤ 0.5 mm, inoculum size of 1×10^7 spore/ml, incubated at $30 \pm 2^\circ\text{C}$, without mixing effect, with the addition of 2% (w/w) molases and 4% (w/w) ammonium nitrate

and with the cultivation time of 5 days. For the other tray size (45x40x7 cm), the optimised cultural conditions and fermentation medium were 0.5 cm substrate thickness (400 g substrate quantity), 80% (v/w) water content, particle size of substrate ≤ 0.5 mm, inoculum size of 1×10^7 spore/ml, incubated at $30 \pm 2^\circ\text{C}$, need to mix for every 24 hours, with the addition of 2% (w/w) molases and 4% (w/w) ammonium nitrate and with the cultivation time of 5 days. A total mannanase production was 701.53 ± 0.82 U/g substrate (for the tray size of 27x19x6 cm) and 918.68 ± 1.59 U/g substrate (for the size of 45x40x7 cm). Compared to a flask system, the increment was about 62% (for the tray size of 27x19x6 cm) and 112% (for the tray size of 45x40x7 cm). A crude mannanase was purified by ultrafiltration, Superdex 75 gel filtration chromatography and Q-Sepharose Fast Flow anion exchange chromatography. The purified mannanase was homogenous on SDS-PAGE. The purified mannanase had a specific activity of 196.42 U/mg, with 0.55% recovery and overall purification of 4-fold. The molecular mass of purified mannanase estimated by SDS-PAGE was about 47.4 kD. The optimal pH and temperature for purified and crude mannanase activity was 4.0 and 60°C , respectively. Both enzymes were stable at pH 4.0 and temperature of 60°C until 30 minutes. Chemicals and anions such as Sr^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , EDTA, 2-mercaptoethanol and SDS at the concentration of 1.0 mM inhibited the purified mannanase activity. Overall, sodium dodecyl sulfate (SDS) became the most inhibitor component compared to other metal anions and chemicals. Mannanase activity was highly specific towards locust bean gum (LBG) at the concentration of 0.5% (w/v).

BAB 1

PENGENALAN

1.1 Kepelbagaian sisa buangan agroindustri

Sektor pertanian mampu memberikan pulangan lumayan kepada individu atau sesebuah negara. Maka, tidak hairanlah jikalau kebanyakan negara yang sedang membangun seperti beberapa buah negara Asia serta negara yang maju seperti Amerika Syarikat dan beberapa negara Eropah masih memilih sektor pertanian atau agroindustri sebagai salah satu penjana ekonomi negara. Namun, dalam masa yang sama berlaku penimbunan sisa-sisa agroindustri yang akan menjadi masalah global jika tiada tindakan yang berkesan diambil.

Malaysia adalah salah sebuah negara yang masih bergantung kepada industri pertanian. Biasanya, sisa buangan agroindustri seperti jerami padi, sekam padi, daun dan hampas tebu, daun jagung, habuk kayu, pelepah, tandan dan isirong kelapa sawit, hampas serta sabut kelapa, kulit buah-buahan seperti tebu, sagu, nenas, koko, pisang, ubi kayu dan sebagainya dibuang begitu sahaja di lapangan tanpa dimanfaatkan sepenuhnya.

1.2 Masalah semasa berkaitan dengan sisa buangan agroindustri

Sisa buangan agroindustri boleh juga dikategorikan sebagai sisa biojisim. Bagi kebanyakan negara yang bergantung kepada sektor ini, isu penghapusan sisa buangan tersebut sentiasa menjadi masalah utama. Petani-petani di kawasan pedalaman Malaysia mengambil inisiatif mudah dengan melakukan pembakaran terbuka. Aktiviti tersebut menjadi fenomena pada hari ini terutamanya semasa musim panas dan hasilnya dapat

dilihat dengan berlakunya pencemaran udara. Hal ini juga berlaku kerana tiada regulasi perlindungan alam sekitar atau kekurangan usaha menangani masalah tersebut menyebabkan para petani terus menerus menjalankan aktiviti tersebut. Bagi para petani, amalan membakar sisa-sisa tersebut contohnya sisa padi, akan lebih menyuburkan tanah sebelum proses penanaman seterusnya dilakukan. Selain itu juga, ia melibatkan kos yang rendah serta mengambil masa yang tidak lama. Namun, kesan negatif hasil daripada pembakaran tersebut adalah lebih tinggi berbanding faedah.

Pembakaran sisa biojisim menjadi antara punca kepada pembebasan gas rumah hijau, karbon dioksida, metana, dan nitrus oksida (N_2O). Selain itu, aktiviti tersebut juga turut membebaskan gas kimia yang aktif termasuklah karbon monoksida, hidroksida bukan metana dan nitrogen dioksida (NO_2). Gabungan gas-gas ini dengan metana akan menyumbang kepada penghasilan bahan kimia dalam ozon troposfera. Selain itu, ia juga akan mengawal kepekatan radikal hidroksida yang terlibat dalam regulasi kitaran penghasilan gas atmosfera yang lain (Levine, 1994).

Walaupun sesetengah residu agroindustri seperti bahagian batang kelapa sawit, boleh digunakan sebagai baja namun ia melibatkan proses penguraian semula jadi yang memerlukan masa yang lama sehingga lama kelamaan ia boleh menjadi habitat untuk serangga-serangga perosak (Ahmad *et al.*, 2002).

1.3 Penukaran sisa buangan agroindustri kepada bentuk bernilai

Disebabkan kesan sisa buangan agroindustri memberi impak besar kepada dunia, maka para penyelidik digesa untuk mencari penyelesaian yang saintifik dan efektif yang merangkumi kepentingan pada peringkat individu mahupun industri. Walau bagaimanapun, ia memerlukan teknologi baru yang terbukti keberkesannya dan mampu bersaing dari segi kos pengeluaran.

Umumnya, sisa buangan agroindustri terbina daripada bahan berlignoselulosa yang terdiri daripada tiga komponen utama iaitu lignin, selulosa, dan hemiselulosa. Penukaran bahan berlignoselulosa kepada bentuk bernilai tambah memerlukan pelbagai proses termasuklah; (1) rawatan awal atau pra-rawatan sama ada secara mekanikal, kimia, atau biologi (Grethlein & Converse, 1991); (2) hidrolisis polimer bagi menghasilkan molekul yang tersedia mempunyai metabolisme contohnya gula pentosa; (3) penggunaan secara biologi molekul tersebut untuk menyokong pertumbuhan mikrob atau untuk menghasilkan produk kimia; dan (4) proses pengasingan dan penulenan (Smith *et al.*, 1987).

Pada hari ini, kajian untuk menukarkan sisa buangan tersebut kepada etanol sedang rancak dijalankan. Etanol adalah bahan tenaga baru yang boleh berpotensi menjadi bahan api untuk kenderaan. Penghasilannya melibatkan kos yang rendah, namun, menurut Prasad *et al.* (2007), keefisienan penukaran sisa buangan agro menjadi etanol bergantung kepada keupayaan mikroorganisma yang digunakan dalam proses utilisasi sumber-sumber karbon dan beberapa fraksi lain yang hadir dalam sisa buangan tersebut.

Selain itu, Didik *et al.* (2006) telah menemui cara penukaran hampas padi menjadi beta zeolit. Dalam hampas padi, terdapat sumber silika yang boleh digunakan untuk sintesis komponen tersebut. Beta zeolit adalah bahan katalis yang diaplikasi dalam petrokimia dan sintesis bahan kimia.

Laporan oleh Pandey *et al.* (2000b) menyatakan sisa buangan berhampas boleh menghasilkan pelbagai bahan yang bernilai seperti asid L-glutamik, alkaloid ergot iaitu sejenis bahan untuk merangsang sistem saraf simpatetik yang memberi kesan terhadap otot licin dan juga kesan antagonisme kepada hormon adrenalin dan serotonin (Ibrahim, 1994), sebagai sokongan dalam penghasilan penisilin, penghasilan aroma buah-buahan serta beberapa jenis asid iaitu asid laktik dan sitrik.

Dalam bidang pemfermentasian pula, sisa buangan agro digunakan untuk menghasilkan enzim. Proses fermentasi melibatkan penggunaan mikroorganisma seperti bakteria, yis dan kulat bagi tujuan menghasilkan pelbagai enzim seperti lipase, mannanase, protease, xilanase, selulase dan sebagainya. Terdapat dua kaedah dalam pemfermentasian iaitu pemfermentasian kultur tenggelam (SmF) dan pemfermentasian substrat pepejal (SSF).

Pelbagai lagi penyelidikan sedang giat dijalankan untuk memaksimumkan penghasilan produk yang bernilai tambah terutamanya kepada industri. Sehingga hari ini, kebanyakan kajian yang telah dibuat membuktikan bahawa sisa buangan agro sangat berpotensi dalam pelbagai bidang kajian.

1.4 Objektif kajian

Malaysia terkenal sebagai negara asas tani sejak awal kemerdekaannya lagi. Sehingga ke hari ini, sektor tersebut masih menjadi punca utama ekonomi negara. Malaysia adalah antara negara yang menyumbang kepada penghasilan hasil buangan kelapa sawit yang tertinggi di dunia dan sisa tersebut menjadi keluaran eksport Malaysia. Pelbagai sisa buangan telah dihasilkan daripada kelapa sawit termasuklah isirong kelapa sawit (PKC), hampas kelapa sawit (PKM), pelepah kelapa sawit, enap cemar kelapa sawit (POME), daun kelapa sawit, dan tandan kosong. Oleh yang demikian, dalam usaha untuk memanfaatkan sisa ini, kajian tentang penghasilan enzim mannanase oleh pencilan kulat tempatan menggunakan isirong kelapa sawit (PKC) melalui pemfermentasian substrat pepejal (SSF) telah dijalankan. Antara objektif-objektif kajian ini adalah seperti berikut:

1. Untuk menyaring pencilan kulat penghasil mannanase menggunakan isirong kelapa sawit (PKC) sebagai substrat
2. Untuk mengenalpasti pencilan kulat yang telah menghasilkan mannanase secara maksimum
3. Untuk mengoptimumkan parameter-parameter fizikal dan kimia melalui sistem pemfermentasian substrat pepejal (SSF) bagi meningkatkan penghasilan mannanase oleh pencilan kulat terpilih

4. Untuk membandingkan peningkatan penghasilan mannanase menggunakan sistem kelalang goncangan dan dulang cetek
5. Untuk menulen dan mencirikan enzim mannanase tulen yang dihasilkan oleh pencilan kulat terpilih
6. Untuk membandingkan ciri-ciri enzim mannanase ekstrak kasar dan tulen dari segi kestabilan pH dan suhu

BAB 2

TINJAUAN BACAAN

2.1 Komponen utama dalam sisa agroindustri: lignoselulosa

Kebanyakan sisa agroindustri di Malaysia terdiri daripada tumbuhan. Struktur komponen utama tumbuhan, sama ada yang berkayu atau tidak berkayu adalah lignoselulosa. Komponen tersebut terdiri daripada lignin, hemiselulosa, dan selulosa (Howard *et al.*, 2003). Komposisi kimia dalam tumbuhan berbeza dan dipengaruhi oleh genetik serta faktor persekitaran (Malherbe & Cloete, 2002). Lignoselulosa adalah substrat yang kompleks dan biodegradasinya tidak bergantung semata-mata kepada keadaan persekitaran sahaja tetapi kapasiti degradasi populasi mikrob turut diambil kira (Waldrop *et al.*, 2000). Jadual 2.1 menunjukkan peratusan komponen lignoselulosa dalam residu agroindustri.

2.1.1 Selulosa

Selulosa adalah karbohidrat utama yang disintesis oleh tumbuhan dan sekali gus menyebabkan ia sebagai polimer organik yang paling tinggi penimbunannya di persekitaran. Komponen selulosa terdiri daripada polimer linear β -(1,4) yang dihubungkan dengan residu glukosa anhidrous (Anthony, 1997) dan ia selalunya disusun dalam struktur mikrohابلur yang sangat susah untuk dilarutkan dan dihidrolisis dalam keadaan semulajadi (Malherbe & Cloete, 2002). Komposisi utama selulosa terdiri daripada karbon (44.2%), oksigen (49.5%) dan hidrogen (6.3%) dengan formula molekul $(C_6H_{10}O_5)_n$. Keefisienan hidrolisis oleh selulosa memerlukan sekurang-kurangnya tiga enzim iaitu: (1) endoglukanase yang berfungsi untuk memecahkan ikatan intermonomer;

Jadual 2.1: Peratusan komponen lignoselulosa dalam residu agroindustri
(diubahsuai daripada Howard *et al.*, 2003)

Bahan yang mengandungi lignoselulosa	Selulosa (%)	Hemiselulosa (%)	Lignin (%)
Batang tumbuhan berkayu keras	40-55	24-40	18-25
Batang tumbuhan berkayu lembut	45-50	25-35	25-35
Rumput	25-40	25-50	10-30
Batang padi	32.1	24	18
Batang pokok gandum	30	50	15
Daun	15-20	80-85	0
Kulit kacang	25-30	25-30	30-40
Batang jagung	45	35	15

(2) eksoglukanase bertindak untuk menyingkirkan mono- dan dimer- daripada rantai akhir glukosa; dan (3) β -glukosidase pula berperanan untuk menghidrolisis dimer glukosa (Malherbe & Cloete, 2002). Hasil akhir penguraian selulosa ialah glukosa, selobiosa, dan oligosakarida yang mempunyai berat molekul yang tinggi.

2.1.2 Lignin

Lignin mewakili antara 26 hingga 29% daripada lignoselulosa dan terikat kuat kepada selulosa dan hemiselulosa. Komposisi utama lignin iaitu karbon 65.5% dan hidrogen 6.1%, walau bagaimanapun ia bergantung kepada jenis kayu. Ia juga bertindak mempertahankan komponen selulosa dan hemiselulosa daripada tindakan hidrolase (Raimbault, 1998). Terdapat dua enzim lignolisis yang memainkan peranan dalam degradasi iaitu fenol oksidase (lakase) dan peroksidase (lignin peroksidase dan mangan peroksidase; Howard *et al.*, 2003). Walau bagaimanapun lignin peroksidase merupakan enzim utama yang terlibat dalam degradasi lignin.

2.1.3 Hemiselulosa

Komponen ini berasosiasi dengan selulosa di dalam dinding sel tumbuhan. Ia terdiri daripada pelbagai himpunan polisakarida yang larut dalam alkali dan ini termasuklah bahan poligalakturonan (bahan pektin), β -D-glukan dan beberapa heteropolisakarida seperti yang terkandung dalam galaktosa, mannos, dan xilosa iaitu arabinogalaktan, galaktoglukomannan dan glukomannan serta arabinoglukoronoxilan dan glukoronoxilan. Walau bagaimanapun, hanya heteropolisakarida yang mempunyai darjah pempolimeran yang rendah (100-200 unit) berbanding selulosa (10000-14000 unit) yang dirujuk sebagai

hemiselulosa. Komponen gula hemiselulosa adalah D-xilosa, D-mannosa, D-glukosa, D-galaktosa, L-arabinosa, asid D-glukoronik, asid 4-O-metil-D-glukoronik, asid D-galaktoronik, L-rhamnosa, L-fukosa dan pelbagai gula O-metil (Howard *et al.*, 2003). Xilan adalah komponen utama hemiselulosa dalam tumbuhan. Tumbuhan berkayu keras mengandungi antara 20-25% xilan manakala kayu lembut pula mengandungi 7-12% (Whistler & Richards, 1970). Jadual 2.2 merumuskan enzim hemiselulase utama dan pengelasannya.

2.2 Kelapa sawit sebagai sumber ekonomi Malaysia

Pokok kelapa sawit (*Elaeis guineensis*) yang dibawa masuk pertama sekali ke Malaysia dari Afrika sebagai pokok hiasan tetapi kini telah menjadi satu tumbuhan penting dalam pertanian sebagai tanaman komersial (Abdul Rahman, 1996). Pengilangan minyak kelapa sawit adalah industri utama di Malaysia. Pada tahun 2000, kawasan penanaman tumbuhan ini sahaja meliputi 3.375 juta hektar (Chin, 2002). Secara umumnya buah kelapa sawit terdiri daripada serabut buah (perikarp) dan isi (kernel). Serabut buah kelapa sawit terdiri dari tiga lapis iaitu lapisan luar atau kulit buah yang disebut perikarp, lapisan sebelah dalam disebut mesokarp dan lapisan paling dalam disebut endokarp. Isi kelapa sawit terdiri dari lapisan kulit biji (testa), endosperma dan embrio. Gambarfoto 2.1 menunjukkan bahagian luar dan dalam buah kelapa sawit manakala Gambarfoto 2.2 menunjukkan pokok kelapa sawit yang terdapat di Malaysia (Musuem Agropolis, 2007).

Jadual 2.2: Enzim utama hemiselulase dan pengelasannya (Ubahsuai daripada Howard *et al.*, 2003)

Enzim	Substrat	Nombor EC
Ekso- β -1,4-xilosidase	β -1,4-xilooligomer xilobiosa	3.2.1.37
Endo- β -1,4-xilanase	β -1,4-xilan	3.2.1.8
Ekso- β -1,4-mannosidase	β -1,4-mannooligomer mannobiosa	3.2.1.25
Endo- β -1,4-mannanase	β -1,4-mannan	3.2.1.78
Endo- α -1,5-arabinase	α -1,5-arabinan	3.2.1.99
α -L-arabinofuranosidase	α -arabinofuranosil (1 \rightarrow 2) atau (1 \rightarrow 3) xilooligomer α - arabinan	3.2.1.55
α -glukoronidase	4-O-metil- α -asid glukoronik (1 \rightarrow 2) xilooligomer	3.2.1.39
α -galaktosidase	α -galaktopiranosa (1 \rightarrow 6) mannoooligomer	3.2.1.22
Endo-galaktanase	β -1,4-galaktan	3.2.1.89
β -glukosidase	β -glukopiranosa (1 \rightarrow 4) mannopiranosa	3.2.1.21
Asetil xilan esterase	2 atau 3-O-asetil xilan	3.1.1.72
Asetil mannan esterase	2 atau 3-O-asetil mannan	3.1.1.6
Ferulik dan p-asid kumarik esterase	2 atau 3-O-asetil mannan	3.2.1.73



Bahagian serabut

Bahagian isi

Gambarfoto 2.1: Bahagian luar dan dalaman buah kelapa sawit



Gambarfoto 2.2: Pokok kelapa sawit yang tumbuh di Malaysia

Mesokarp mengandungi kadar minyak rata-rata sebanyak 56%, isi mengandungi minyak sebesar 44%, dan endokarp tidak mengandungi minyak. Minyak kelapa sawit terdiri daripada trigliserida yang merupakan ester dari gliserol dengan tiga molekul asid lemak. Tindakbalas penghasilan trigliserida adalah seperti berikut:



Malaysia, Indonesia dan Nigeria menghasilkan 84% pengeluaran buah kelapa sawit dunia. Buah tersebut mengandungi sekurang-kurangnya 50% minyak dan 70 hingga 80% dibuang melalui pengekstrakan. Hasil pengekstrakan minyak ini dikenali sama ada sebagai isirong kelapa sawit (PKC) atau hampas kelapa sawit (PKM), bergantung kepada cara pemprosesannya. PKC adalah residu isirong daripada proses pengekstrakan mekanikal manakala PKM pula adalah bahan daripada pengekstrakkan kimia atau cecair (Jaafar *et al.*, 2004). Kedua-dua produk tersebut juga berbeza dari segi komposisi kimia seperti kalsium, minyak dan fiber (Choct, 2000).

2.3 Proses penghasilan minyak dan sisa buangan kelapa sawit

Pada awalnya, semua kilang di Malaysia menggunakan pengektrakan mekanikal untuk pemulihan minyak. Walau bagaimanapun, disebabkan oleh penghasilan jumlah buah kelapa sawit semakin meningkat maka pengusaha digesa mencari kaedah alternatif lain iaitu mengekstrak dengan menggunakan cecair. Sekarang, terdapat tiga cara

pengekstrakan yang digunakan iaitu melalui pengekstrakan mekanikal menggunakan penekanan skrew yang bertekanan tinggi, pengekstrakan cecair dan gabungan pengekstrakan mekanikal dan cecair (Tang & Teoh, 1985). Hasil daripada ketiga-tiga proses ini adalah PKC dan PKM yang boleh digunakan di peringkat industri untuk penghasilan produk bernilai tambah.

2.3.1 Pengekstrakan mekanikal

Terdapat tiga langkah utama iaitu rawatan awal buah, penekanan skrew dan penulenan minyak. Proses rawatan awal buah melibatkan pembersihan daripada bendasing yang boleh menyebabkan kerosakan pada skrew penekan yang selanjutnya akan meningkatkan kos penyelenggaraan, melambatkan masa serta mencemarkan produk. Buah sawit tersebut kemudiannya dipecahkan kepada fragmen-fragmen yang kecil dan melalui proses pengewapan. Proses pengewapan bertujuan untuk meningkatkan kandungan kelembapan pada pecahan isi buah kelapa sawit, memecahkan dinding sel, mengurangkan kelikatan minyak dan untuk melikatkan protein dalam hampas yang akan memudahkan pemisahan minyak daripada bahagian protein. Pecahan buah kelapa sawit biasanya dirawat dengan kandungan kelembapan 3% pada suhu 104-110⁰C. Hampas buah tadi seterusnya akan melalui proses penekanan skrew menggunakan skrew penekan. Skrew penekan mengandungi benang heliks (berbentuk seperti cacing) yang berputar bersama dengan barel. Minyak yang terhasil akan dialirkan melalui lubang-lubang yang terdapat dalam barel. Proses seterusnya adalah penulenan minyak. Minyak yang terhasil daripada penekanan skrew biasanya masih mengandungi bendasing yang harus disingkirkan. Jadi, minyak tersebut dialirkan ke tangki simpanan dan seterusnya dipam ke bahagian

penapisan untuk tujuan penyingkiran bendasing. Di sini, isirong kelapa sawit dikeluarkan dari penekan dan disimpan. Pengekstrakan ini lebih sering digunakan kerana ia melibatkan kos yang murah.

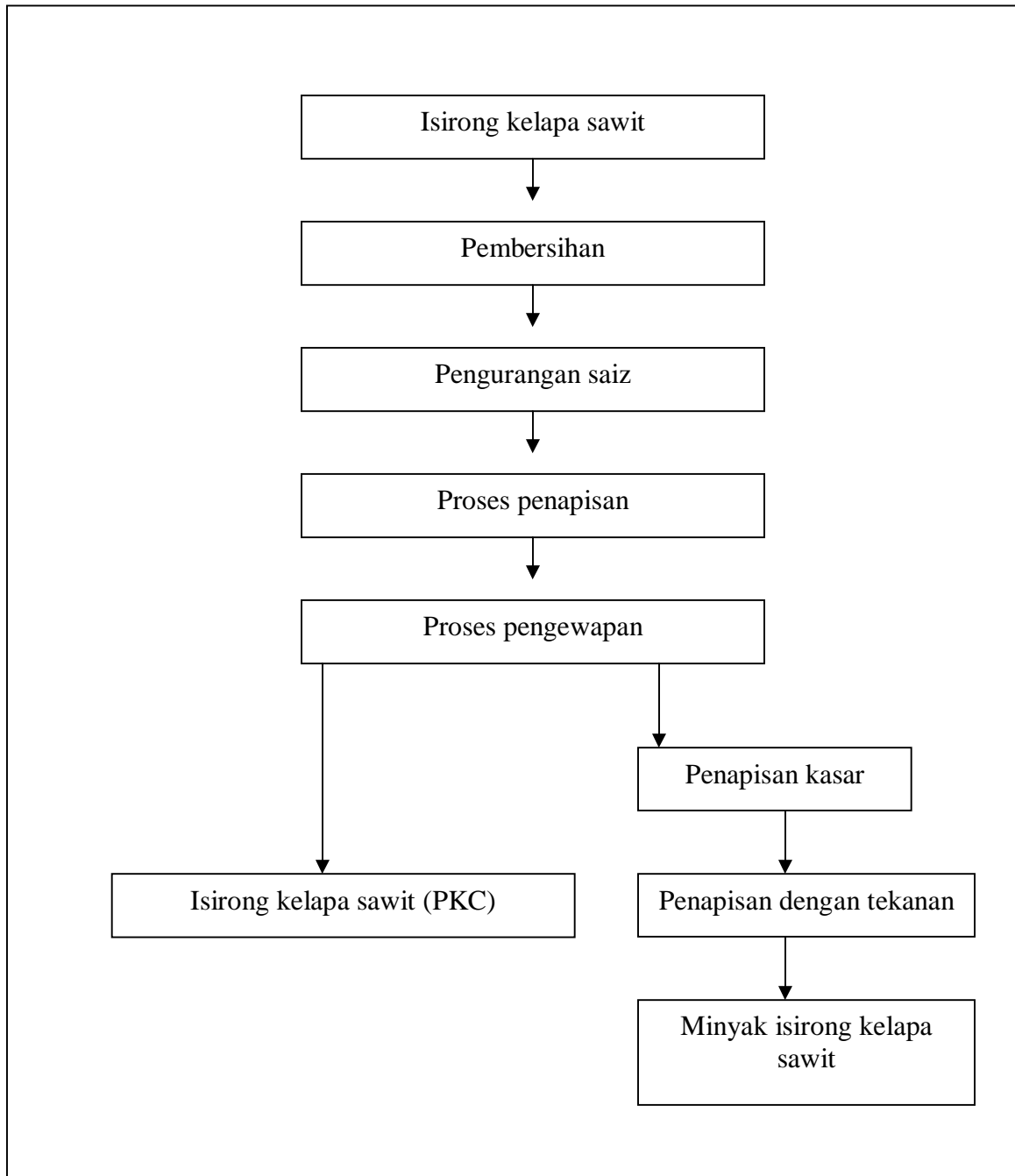
2.3.2 Pengekstrakan cecair dan kimia

Proses ini dibahagikan kepada tiga unit operasi iaitu rawatan awal buah, pengekstrakan minyak dan pemulihan cecair daripada minyak dan hampas.

2.3.3 Gabungan pengekstrakan mekanikal dan cecair

Gabungan ini adalah kaedah yang sedang dipraktikkan di Malaysia. Dalam proses ini, buah yang telah diberi rawatan awal akan melalui proses penghancuran dahulu. Buah yang dihancurkan itu mengadungi sekurang-kurangnya 15-20% minyak. Seterusnya, fragmen-fragmen tersebut diekstrak dengan menggunakan cecair untuk menyingkirkan minyak yang masih tertinggal. Rajah 2.1 menunjukkan ringkasan proses penghasilan minyak kelapa sawit yang digunakan di Malaysia.

Melalui proses tersebut terhasillah minyak serta sisa buangan kelapa sawit. Umumnya, minyak kelapa sawit mengandungi zat yang terdiri daripada α -karotein, β -karotein, xantofil, klorofil dan antosianin. Zat-zat warna tersebut menyebabkan minyak berwarna kuning, kuning kecoklatan, kehijau-hijauan dan kemerahan (Nurhida, 2004). Oleh itu, hal ini sekali gus menyumbangkan zat kepada sisa buangannya walaupun dalam peratusan yang rendah.



Rajah 2.1: Penghasilan minyak dan sisa buangan kelapa sawit yang digunakan di Malaysia (Malaysia Palm Oil Board, MPOB, 2006)

2.4 Nilai permakanan dalam isirong kelapa sawit (PKC)

Isirong kelapa sawit (PKC) merupakan hasil residu yang paling berguna berbanding yang lain di Malaysia kerana telah menyumbang dalam pasaran ekonomi negara dan antarabangsa. Pada tahun 2006, Malaysia telah menghasilkan 2.20 juta tan isirong kelapa sawit dan 2.12 juta tan telah dieksport. Ia menjadi pengeksport terbesar dunia (Malaysia Palm Oil Board, MPOB, 2006). Negara-negara Kesatuan Eropah sahaja telah mengimport lebih daripada 85% isirong kelapa sawit Malaysia setahun (Saw *et al.*, 2008).

PKC merupakan sumber protein dan tenaga tetapi sekiranya dikaji dengan lebih mendalam, ia sebenarnya bertindak lebih sebagai sumber protein. Nilai protein PKC adalah lebih tinggi daripada hampas kelapa tetapi lebih rendah berbanding hampas ikan dan hampas kacang tanah. Kandungan minyak dan fiber kasar dalam PKC adalah masing-masing sebanyak 12.3% dan 9.8% (Choct, 2000). Selain itu, ia juga mengandungi polisakarida bukan kanji (NSP) yang tinggi iaitu 74.3%. Komponen NSP dipercayai adalah linear mannan yang tidak larut (78% daripada jumlah NSP) dengan penukaran galaktosa yang rendah. Mannan terbina daripada polimer mannos. Menurut Jaafar *et al.* (2004), mannos adalah gula yang dominan di dalam PKC iaitu 75%. Hal ini diikuti oleh selulosa (12%) dan sejumlah kecil 4-O-metilglukoronoxilan (3%) dan arabinoxilan (3%). Jadual 2.3 dan Jadual 2.4 masing-masing menunjukkan kandungan asid amino dan sumber nutrien lainyang terkandung di dalam PKC.

Jadual 2.3: Komposisi asid amino dalam PKC (Yeong *et al.*, 1983)

Protein/ Asid amino	Komposisi asid amino dalam PKC (%)
Alanina	0.92
Arginina	2.18
Asid aspartik	1.55
Sisteina	0.20
Asid glutamik	3.15
Glisina	0.82
Histidina	0.29
Isoleusina	0.62
Leusina	1.11
Lisin	0.59
Methionina	0.30
Fenilalanina	0.73
Prolina	0.62
Serina	0.69
Threonina	0.55
Triptofam	0.17
Tirosina	0.38
Valina	0.93

- Jumlah protein dalam PKC ialah 16.06%

Jadual 2.4: Kandungan pelbagai nutrisi yang terdiri daripada sumber garam mineral serta fiber dalam PKC (Chin, 2002)

Komponen	Pengekstrakan cecair			Pengekstrakan mekanikal		
	1	2	3	1	2	3
Bahan kering(%)	89	92	91	92.7	93	89.1
Protein kasar(%)	15.3	15.2	15	14.6	14.8	16
Fiber kasar(%)	14.3	16	15.6	12.1	15.7	16.8
Asid fiber detergen(%)	46.1	46	40	41.8	44	39.6
Fiber detergen neutral(%)	66.7	-	-	66.4	-	-
Ekstrak eter(%)	2.9	1.8	0.9	9.1	9.8	10.6
Habuk(%)	4.1	3.8	3.5	4.3	4.2	4.1
Ekstrak bebas nitrogen(%)	63.4	63.2	65	59.9	55.5	52.5
Jumlah nutrien tercerna, TDN(%)	75	70	75	72	67	70
Kalsium(%)	0.2	0.25	-	0.21	0.20	-
Fosforus(%)	0.54	0.52	-	0.52	0.32	-
Magnesium(%)	-	0.16	-	-	-	-
Kuprum(ppm)	34	28.5	-	18	-	-
Ferum(mg/kg)	-	4.05	-	-	-	-
Manganese(mg/kg)	-	22.5	-	-	-	-
Zink(mg/kg)	-	77	-	-	-	-

2.5 Takrifan proses pemfermentasian substrat pepejal (SSF)

SSF ditakrifkan sebagai proses pemfermentasian yang melibatkan bahan pepejal tanpa kehadiran air atau dengan kehadiran air yang rendah. Walau bagaimanapun, substrat yang digunakan mestilah mampu menyumbang kelembapan yang mencukupi untuk sokongan pertumbuhan dan metabolisme mikroorganisma (Pandey, 2003). Umumnya, terdapat dua sistem dalam SSF yang boleh dibezakan melalui fasa substrat semulajadi yang digunakan. Sistem yang biasa digunakan ialah pengkulturan pada sokongan substrat semulajadi (sisa buangan agroindustri) dan satu lagi sistem yang jarang digunakan iaitu pengkulturan pada sokongan yang kaku atau tidak bergerak yang digabungkan dengan medium cecair (Ooijkaas *et al.*, 2000). Objektif utama SSF adalah untuk menjadikan mikroorganisma yang digunakan dapat berhubung terus dengan substrat yang tidak larut dan sekali gus menghasilkan kepekatan substrat yang tinggi dalam proses pemfermentasian.

2.6 Aspek umum dalam SSF

Terdapat beberapa aspek yang perlu dipertimbangkan dalam membangunkan sebarang proses biologi dalam SSF. Hal ini termasuklah penyesuaian mikroorganisma dan substrat, pengoptimuman parameter serta pemencilan dan penulenan produk. Namun, teori asasnya adalah berdasarkan kepada aktiviti air kerana hanya kulat, yis serta beberapa jenis bakteria yang sesuai untuk SSF (Pandey, 2003).

2.6.1 Penglibatan mikroorganisma dalam SSF

Kulat peringkat tinggi seperti daripada kelas Ascomycetes dan Basidiomycetes kebiasaannya menjadi pilihan untuk bertumbuh pada substrat pertumbuhan (Holker *et al.*, 2004). Kebolehan mikroorganisma tumbuh pada substrat pepejal bergantung kepada keperluannya terhadap aktiviti air, kapasiti sokongan serta penembusannya ke dalam substrat dan juga kebolehannya untuk menyerap campuran pelbagai polisakarida yang hadir di dalam substrat (Perez-Guerra *et al.*, 2003).

Dalam SSF, kulat dan yis lebih menjadi pilihan utama kerana secara logiknya, medium dalam SSF adalah menyerupai habitat semulajadi mikroorganisma terbabit dan sekali gus meningkatkan aktivitinya (Pandey, 2003). Bakteria tidak begitu dipilih dalam sistem SSF kerana kebanyakannya memerlukan aktiviti air yang tinggi. Tetapi, terdapat beberapa jenis bakteria yang mampu hidup di dalam persekitaran SSF.

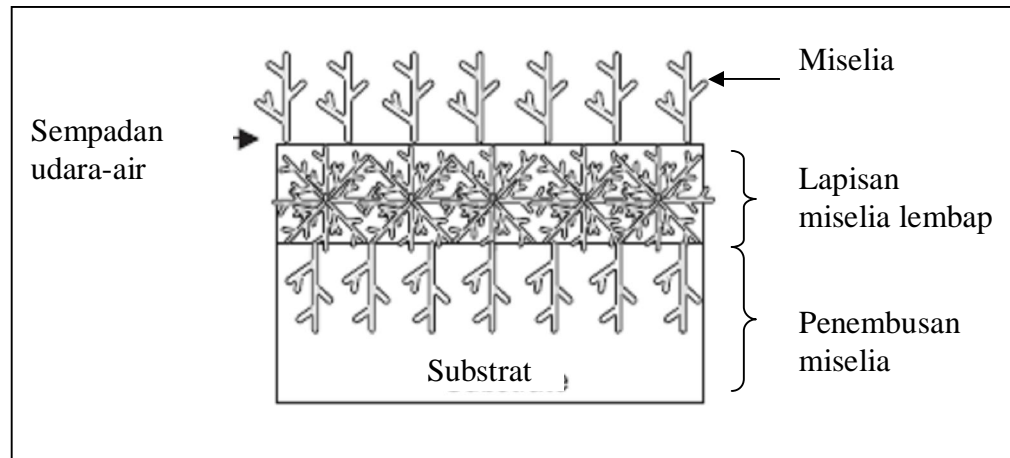
Kulat berfilamen merupakan mikroorganisma terbaik yang mampu beradaptasi dengan sistem SSF kerana memiliki ciri-ciri fisiologi, enzimologi dan biokimia. Sifat pertumbuhan hifa yang ada pada kulat memberikan kelebihan kepada kulat berfilamen untuk menembusi jauh ke dalam substrat pepejal. Keadaan ini juga menyebabkan kulat berfilamen berkelebihan dalam mengkolonisasi substrat dan mengutilisasikan nutrien yang hadir berbanding mikroorganisma unisel. Tambahan pula, kebolehan kulat berfilamen hidup dalam keadaan aktiviti air yang rendah dan tekanan osmosis atau

kepekatan nutrien yang tinggi menjadikannya lebih efisien dan bersifat kompetitif dengan mikroflora semulajadi dalam proses penukaran biologi substrat pepejal (Raimbault, 1998).

Cara pertumbuhan mikroorganisma adalah melalui antara celah substrat contohnya dalam matriks substrat atau pada permukaan substrat. Biojisim mikrob di dalam matriks substrat dan pada permukaan substrat akan menggunakan substrat tersebut dan merembeskan bahan metabolit dan enzim (Rahardjo *et al.*, 2006). Rajah 2.2 menunjukkan cara pertumbuhan dan penembusan kulat pada substrat. Pemilihan strain yang sesuai untuk tujuan tertentu pula adalah bergantung kepada beberapa faktor seperti keadaan substrat tersebut dan keadaan persekitaran (Pandey *et al.*, 1999). Pengubahsuaian genetik terhadap kulat juga dapat membantu pemilihan strain supaya satu strain yang lebih sesuai dan baik mengikut kepentingan dan keperluan dapat dibentuk dan seterusnya membantu melipat gandakan hasil yang diinginkan.

Sejak tahun 1917 iaitu semasa penghasilan asid sitrik dapat dihasilkan oleh *A. niger* pada permukaan kultur sokongan pepejal, kumpulan kulat ini mula menjadi model dalam teknologi SSF sehingga kini. Pertumbuhan kulat tersebut adalah amat baik dalam sistem SSF dan sekali gus memberikan penghasilan biojisim yang tinggi serta keefisienan biosintesis enzim dalam keadaan tanpa represi katabolik (Holker *et al.*, 2004). Mengikut Parra *et al.* (2004) pula, genus *Aspergillus* mengandungi kebolehan merembes yang

tinggi sehingga membolehkan ia bertindak sebagai perumah dalam penghasilan protein. Jadual 2.5 menunjukkan beberapa jenis mikroorganisma yang mampu beroperasi dalam SSF.



Rajah 2.2: Pertumbuhan kulat dan cara penembusan pada substrat (Rahardjo *et al.*, 2006)

Jadual 2.5: Peranan beberapa mikroorganisma dalam proses SSF (diubahsuai daripada Rimbault, 1998)

Mikroorganisma	Proses pemfermentasian keadaan pepejal (SSF)
Bakteria:	
<i>Bacillus</i> sp.	Pengkomposan, natto
<i>Pseudomonas</i> sp.	Pengkomposan
<i>Streptococcus</i> sp.	Pengkomposan
<i>Lactobacillus</i> sp.	Makanan
<i>Clostridium</i> sp.	Makanan
Yis:	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Makanan, etanol
<i>Schwanniomyces castelli</i>	Etanol
Kulat:	
<i>Alternaria</i> sp.	Pengkomposan
<i>Aspergillus</i> sp.	Pengkomposan, perindustrian, makanan
<i>Fusarium</i> sp.	Pengkomposan, gibberellin
<i>Mucor</i> sp.	Pengkomposan, makanan, enzim
<i>Rhizopus</i> sp.	Pengkomposan, makanan, enzim, asid organik
<i>Trichoderma</i> sp.	Pengkomposan, pengawalan biologi, bioinsektisid
<i>A. oryzae</i>	Koji, makanan, asid sitrik
<i>A. niger</i>	Makanan ternakan, protein, amylase, asid sitrik
<i>Penicillium notatum</i> , <i>P. roquefortii</i>	Penisillin, keju